Zur Spezifität des Nachweises einer E 605-Aufnahme über die Erfassung von p-Nitrophenol im Harn nach v. Eicken

von

Adolf Herrmann

aus Nördlingen

1966

1966 № 196

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin und Kriminalistik
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Weinig

Zur Spezifität des Nachweises einer E 605-Aufnahme über die Erfassung von p-Nitrophenol im Harn nach v.Eicken.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
zu
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Adolf Herrmann
aus Nördlingen

Erlangen 1966

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN

Dekan: Prof.Dr.Dr. G. Steinhardt

Referent: Prof.Dr.Dr. E. Weinig

Tag der mündlichen Prüfung: 1. Juli 1966

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A) Prinzip des p-Nitrophenolnachweises nach v.Eicken	4
B) Problemstellung	5
C) Die Spezifität des p-Nitrophenolnachweises nach v.Eicken	6
I. Hydrolyse	6
II. Die Reduktion mit Titantrichlorid	8
III. Kupplung mit o-Kresol (Indophenolbildung)	9
α.) Definition	9
β.) Darstellung der Indophenole und Indamine	9
γ.) Tautomerie	11
δ.) Die Lage der Absorptionsmaxima der Farbstoffe	11
D) p-Nitrophenole aus anderen Verbindungen als E 605	13
I. Natürliche aromatische Nitroverbindungen	13
II. Synthetische aromatische Nitroverbindungen	14
1) Insekticide Phosphorsäureester	14
2) Mononitrophenole aus dem Abbau von Dinitrophenolen	15
3) Mononitrophenole aus dem Abbau von Nitrobenzolen und Nitrobenzolderivaten	17

Seite

a) Nitrobenzol und Dinitrobenzole 17
b) Stoffwechsel verschiedener Nitrobenzolderivate 18
α.) Chloramphenicol 18
ß.) Sintrom 19
c) Halogenderivate des Nitrobenzols 20
α.) Monochlornitrobenzole 20
ß.) Dichlornitrobenzole 22
γ.) Trichlornitrobenzole 23
δ.) Tetrachlornitrobenzol 24
ε.) Pentachlornitrobenzol 24
4) Aromatische Nitroverbindungen als Futterzusätze 25

E) Eigene Untersuchungen 26

I. Durchführung des E 605-Nachweises nach v.Eicken 26
II. Zur Störung des p-Nitrophenolnachweises 28
1) Hydrolyse 28
2) Reduktion 29
III. Untersuchung zur Ausscheidung von p-Nitrophenolen anderer Herkunft als aus E 605 31
1) Insekticide 31
2) Dinitrophenole 33
3) Nitrobenzole 37

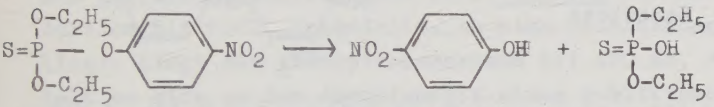
F) Zusammenstellung der Versuchsergebnisse 39

G) Diskussion und Zusammenfassung 42

Literaturverzeichnis 44

) Prinzip des p-Nitrophenolnachweises nach v.Eicken.

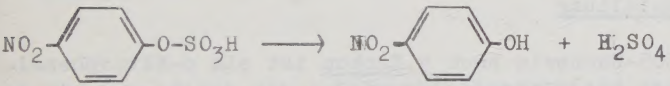
Im Jahre 1954 hat v.Eicken ein Verfahren zum Nachweis einer E 605-Aufnahme angegeben. Nach Aufnahme von E 605 (O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-thionophosphat) wird dieses im menschlichen Organismus in p-Nitrophenol und Diäthylthiophosphorsäure gespalten.



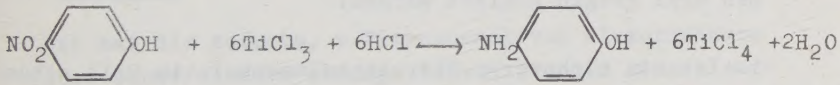
Das p-Nitrophenol wird zum größten Teil an Glukuronsäure oder Schwefelsäure gebunden im Urin ausgeschieden(v.Eicken).

Die v.Eicken'sche Reaktion beruht auf:

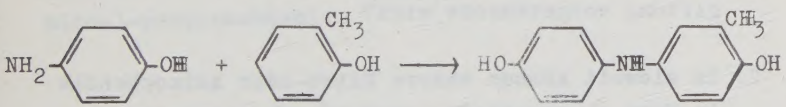
1) Hydrolyse der Glukuron-oder Schwefelsäureester des p-Nitrophenols in salzsaurem Milieu,z.B.:



2) Reduktion des p-Nitrophenols mit $TiCl_3$ zu p-Aminophenol:

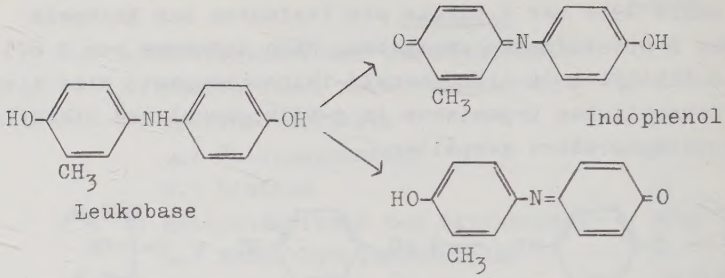


3) Kupplung des entstandenen p-Aminophenols mit o-Kresol zu der Leukobase des Indophenols:



Die Oxydation der Leukobase (durch den Sauerstoff der Luft) führt zu zwei tautomeren,blaugefärbten Indophe-

nolen:



Die beiden tautomeren Verbindungen sind beide gleichzeitig in einem bestimmten Gleichgewicht vorhanden und spektrophotometrisch nicht zu unterscheiden (Mikhailov). Diese Tautomerie ist bei den Indophenolen und Indaminen oft zu beobachten (siehe Abschnitt über Tautomerie).

B) Problemstellung

Der E 605-Nachweis nach v.Eicken ist ein p-Nitrophenolnachweis über die Indophenolblaureaktion. Bei der Untersuchung der Spezifität dieser Nachweismethode müssen drei Fragen geklärt werden:

1. Ist ein sicherer p-Nitrophenolnachweis im Urin schon ein sicherer E 605-Nachweis, oder gibt es andere Stoffe, nach deren Aufnahme gleichfalls p-Nitrophenol in den Harn gelangt, so daß damit eine E 605-Vergiftung vorgetäuscht wird?

2. In wieweit können andere Nitro-oder Aminophenole im Harn ausgeschieden werden, und eine positive Indophenolreaktion ergeben?

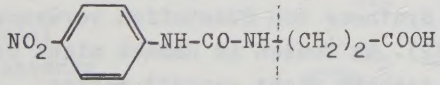
3. Können die unter 1. und 2. genannten Verbindungen durch den Hydrolyseschritt in Freiheit gesetzt werden?

Stoffe, die durch ihren Abbau im Organismus p-Aminophenole in den Harn gelangen lassen (z.B. Phenacetin, Acetanilid u.a.) und so eine Indophenolblaureaktion liefern können, wurden in diesem Zusammenhang nicht untersucht. Diese Fehlerquelle, auf die bereits Kaiser hingewiesen hat, kann ausgeschaltet werden, indem man bei der Nachweismethode nach v.Eicken vor der Reduktion mit $TiCl_3$ feststellt, ob eine Gelbfärbung vorliegt. Liegt das Absorptionsmaximum bei 400 nm, so handelt es sich um das Ammoniumsalz eines p-Nitrophenols, wenn nach Reduktion dieser Verbindung mit $TiCl_3$ in 2nNH_4OH und Kupplung mit o-Kresol eine Indophenolblaureaktion mit dem Absorptionsmaximum bei 620 nm auftritt. Ist die ammoniakalische Lösung farblos, und tritt schon bei Zugabe von o-Kresol, ohne Zugabe von $TiCl_3$, eine Blaufärbung ein, so liegt ein Aminophenol vor.

C) Die Spezifität des p-Nitrophenolnachweises nach v.Eicken.

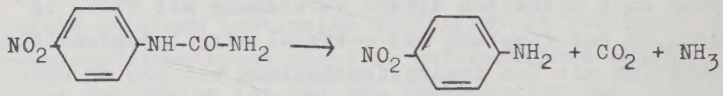
I. Hydrolyse

Sie hat die Aufgabe, p-Nitrophenol von Glukuronsäure oder Schwefelsäure abzuspalten. Störungen können auftreten, wenn auch von anderen Stoffen p-Nitrophenol abgespalten werden kann. Damit ist z.B. zu rechnen bei Aufnahme des Süßstoffes Suosan (ß-(p-Nitrophenylcarbamido-)-propionsäure).



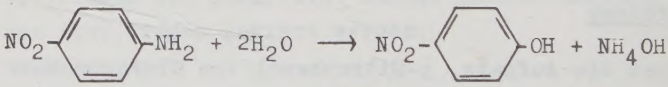
Im Organismus wird wahrscheinlich die Propionsäure leicht abgespalten, während der Nitrobenzolring an den Harnstoff gebunden bleiben soll (Bray, Lake und Thorpe):

Ausgeschiedenes p-Nitrophenylcarbamid dürfte sich bei der Hydrolyse zu p-Nitranilin, Kohlendioxyd und Ammoniak verseifen lassen (Karrer).



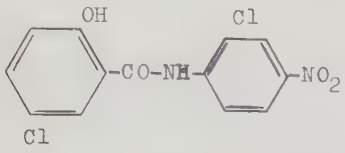
p-Nitrophenylcarbamid p-Nitroanilin

p-Nitroanilin ist aber während der Hydrolyse nicht beständig, sondern dürfte in p-Nitrophenol und Ammoniumhydroxyd (siehe eigene Untersuchungen S. 28) zerfallen.



Da Suosan also wahrscheinlich p-Nitrophenol als Abbauprodukt in den Harn gelangen läßt, kann dieser Süßstoff durch die Nachweismethode nach v.Eicken nicht von E 605 unterschieden werden. Ebenfalls nicht von E 605 unterschieden werden kann das p-Nitranilin, das neuerdings zur Synthese von Süßstoffen verwendet wird (Römpp 1962). Da Suosan im Handel nicht erhältlich war, konnte es deshalb nicht geprüft werden.

Eine Störung wäre auch zu erwarten nach Aufnahme von Yomesan, (n-(2'-Chlor-4-nitrophenyl)-5-chlorsalizylsäureamid).



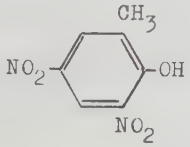
Es ist ein Bandwurmmittel, das bei der Hydrolyse in 4-Nitro-2-chloranilin und 3-Chlorsalizylsäure zerfällt (siehe eigene Untersuchungen).

II. Die Reduktion mit Titantrichlorid.

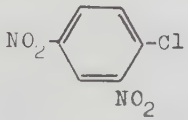
Die Reduktion mit $TiCl_3$ könnte das Untersuchungsergebnis stören, wenn dadurch Di- oder Trinitrophenole zu Mono- bzw. Dinitrophenolen reduziert würden.

Mit folgenden Verbindungen wurden Reduktionsversuche mit $TiCl_3$ in 2nNH_4OH durchgeführt:

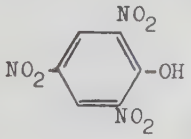
Dinitro-o-cresol



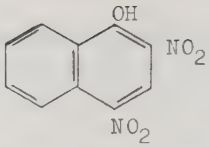
2,4-Dinitrochlorbenzol



Trinitrophenol
= Pikrinsäure



Dinitronaphthol
(=Martiusgelb)



Da durch die Reduktionsversuche keine Veränderung der Absorptionsmaxima eintrat und die Indophenolblaureaktion bei allen negativ ausfiel (siehe eigene Untersuchungen), ist anzunehmen, daß $TiCl_3$ in der angewandten Konzentration nicht stark genug ist, um die Di- und Trinitroverbindungen im alkalischen Milieu zu reduzieren.

Die Anwendung des $TiCl_3$ als Reduktionsmittel erhöht also die Sicherheit des p-Nitrophenolnachweises nach v.Eicken.

III. Die Kupplung mit o-Kresol.

a) Der Vorgang der Indophenol- und Indaminbildung.

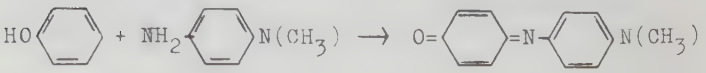
α.) Definition: Als Indophenole bezeichnet man Aminoderivate des Phenylchinonmonimins (I), als Indamin Derivate des Phenylchinondiimins (II) (Karrer).

$O{=}C_6H_4{=}N{-}C_6H_5$ (I) $NH{=}C_6H_5{=}N{-}C_6H_5$ (II)

ß.) Darstellung der Indophenole und Indamine.

Sie erfolgt:

1. Durch Oxydation eines äquimolaren Gemisches eines Phenols und eines p-Diamins, das mindestens eine primäre Aminogruppe enthält (Karrer), z.B.:



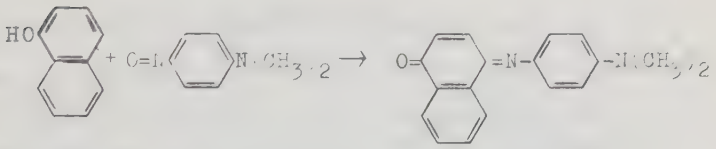
Phenol p-Diamin Indophenolfarbstoff

oder durch Oxydation eines Gemisches von p-Aminophenol und einem Amin.

Die Oxydation kann über Fermente erfolgen:

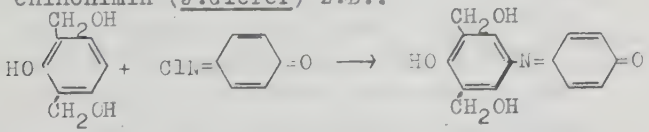
Brachet und Jeener (1944) haben Indophenoloxydase in allen Organen nachgewiesen. Mitolo (1945) hat ein Lösungsmittelgemisch von α-Naphthol, p-Phenylendiamin und Natronlauge zu homogenisiertem Nervengewebe gegeben. Bei Zimmertemperatur und wiederholtem Umrühren bildete sich dann Indophenol im diffusen Licht innerhalb einer Stunde.

2. Durch Kondensation von p-Nitrosoderivaten tertiärer Basen mit Phenolen und Naphtholen (Karrer).



Naphthol p-Nitrosoderivat Indophenol

3. Durch Kupplung von Phenolderivaten mit p-Chlorchinonimin (J.Gierer) z.B.:

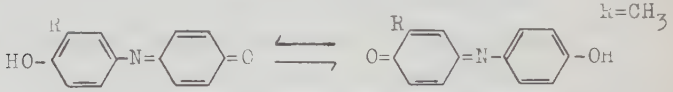


Phenol p-Chlorchinonimin Indophenol

Die Indaminbildung erfolgt analog der Indophenolbildung (Karrer), z.B.:

γ.) Tautomerie.

Tautomere Verbindungen unterscheiden sich durch die Reihenfolge der verknüpften Atome. Bei tautomeren Umwandlungen stellt sich häufig recht rasch und manchmal auch recht einseitig ein thermodynamisches Gleichgewicht zwischen zwei strukturchemisch durchaus verschiedenen Stoffen ein (Hückel). Dies gilt auch für die Tautomerie der Indophenole:

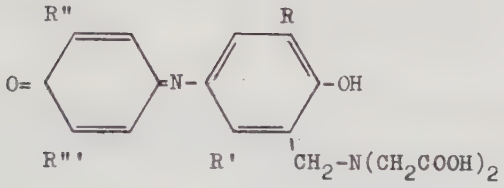


Die Verschiedenheit der Strukturen hat in diesem Falle keine Wirkung auf das Redoxpotential, wenn sich zwischen diesen Formen schnell ein Gleichgewicht eingestellt hat (Mikhailov).

δ.) Die Lage der Absorptionsmaxima der Farbstoffe.

Man kann also auf verschiedenen Wegen (Oxydation, Kondensation, Kupplung, Fermentreaktion) Indophenole und Indamine erhalten. Die Grundstruktur dieser Farbstoffe ist immer die gleiche. Auch Tautomerie ist oft anzutreffen. Es ist nun zu fragen, warum es bei gleicher Grundstruktur zur Bildung verschiedener Farben kommt, und wovon die Lage der Absorptionsmaxima dieser Farben abhängt. Die folgende Tabelle zeigt, daß die Lage der Absorptionsmaxima von der Wasserstoffionenkonzentration, von Substituenten und von der Anwesenheit von Fremdstoffen abhängt. Erarbeitet wurden diese Ergebnisse von Svoboda, Dorazil und Körbl bei der Entwicklung von Metallfarbindikatoren auf der Basis von Indophenolkomplexen. Das 2-Methylacetamin-Indophenol wurde hierbei so substituiert, daß die Halogene jeweils an den Benzochinonkern, die Methylgrup-

pen an den Phenolrest des Moleküls gelangten:



R, R', R", R'" = H : 2-Methylacetamin-indophenol

Absorptionsmaxima in nm

R	R'	R"	R'"	bei pH 3,3	bei pH 3,3+Th^{+4}	bei pH 8,6
H	H	Cl	Cl	515	585	640
H	H	Br	Br	515	585	640
Me	H	Cl	Cl	490	610	610
Me	H	Br	Br	490	610	615
OMe	H	Cl	Cl	480	620	610
OMe	H	Br	Br	480	620	610

Die substituierten Verbindungen wurden bei pH 3,3 und bei pH 8,6 sowie bei pH 3,3 in Gegenwart von Thorium spektrophotometriert. (Dieser Indophenolkomplex wurde zum Nachweis von Thorium, Eisen, Wismut und Skandium verwendet).

Wichtig bei Durchführung der Indophenolblaureaktion ist also hiernach, daß die Wasserstoffionenkonzentration eingehalten wird. Substituierte p-Nitrophenole sind u.U. von nicht substituiertem p-Nitrophenol zu unterscheiden. Der Einfluß von Fremdstoffen ist gleichfalls zu beachten.

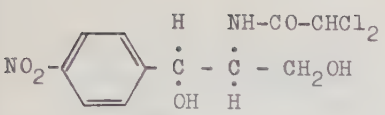
D) p-Nitrophenole aus anderen Verbindungen als E 605.

Durch den p-Nitrophenolnachweis wird nur ein Teil des E 605 Moleküls erfaßt und aus dem Vorhandensein dieses Teiles wird auf die Aufnahme des ganzen E 605-Moleküls geschlossen. Die Sicherheit dieses Schlusses hängt davon ab, ob auch noch aus anderen Verbindungen p-Nitrophenol stammen kann.

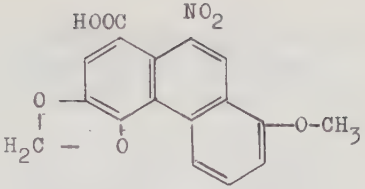
Möglicherweise störende Stoffe sind zu suchen bei den natürlich vorkommenden und den synthetischen aromatischen Nitroverbindungen.

I. Natürliche aromatische Nitroverbindungen.

Die Zahl der natürlich vorkommenden aromatischen Nitroverbindungen, die bis jetzt gefunden wurden, ist sehr klein. Hauptsächlich handelt es sich um das Antibioticum Chloramphenicol und die Aristolochiasäure, den Hauptwirkstoff der Osterluzei. Der Name Aristo-lochia (griech.: ariston locheia) deutet vielleicht darauf hin, daß schon die griechischen Ärzte im Altertum das Mittel bei der Geburtshilfe angewandt haben (Geßner).



Chloramphenicol



Aristolochiasäure

zum Stoffwechsel siehe Seite 18.

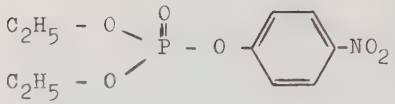
II. Synthetische aromatische Nitroverbindungen.

Die Anzahl der synthetischen aromatischen Nitroverbindungen ist dagegen größer und wächst weiter mit den Fortschritten der Pharmakologie und Chemie. Besonders auf dem Gebiet der Cytostatica und der Schädlingsbekämpfungsmittel gewinnen die aromatischen Nitroverbindungen an Bedeutung.

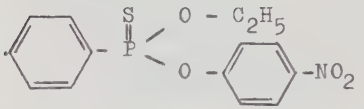
Im Zusammenhang mit dem Nachweis einer E 605-Aufnahme über das p-Nitrophenol ist hier die Herkunft von Mononitrophenolen aus insekticiden Phosphorsäureestern, Dinitrophenolen und Nitrobenzolen zu untersuchen, da diese evtl. p-Nitrophenol als Abbauprodukt in den Harn gelangen lassen könnten.

1) Insekticide Phosphorsäureester

Als ersten insekticiden Phosphorsäureester hat 1944 Gerhard Schrader das Paraoxon entdeckt. Seitdem wurden für die verschiedensten Zwecke und mit abgestufter Toxizität weitere p-Nitrophenol-Phosphorsäureester in Dienst gestellt. Man unterscheidet dabei zwischen Phosphorsäureestern, die in saurem Milieu schwer zu hydrolisieren sind, wie z.B. Paraoxon und E 605.

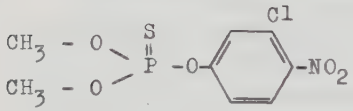


Paraoxon (= E 600)

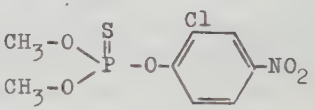


EPN 300

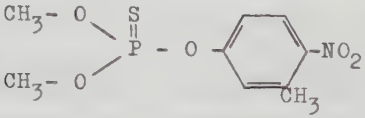
und anderen die ähnlich wie E 605 in saurem Milieu leicht zu verseifen sind, wie z.B. Chlorthion, Isochlorthion und Folithion.



Chlorthion



Isochlorthion



Folithion

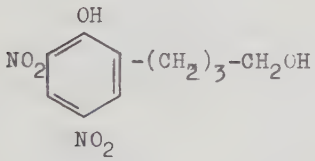
Chlorthion und Isochlorthion, relativ schwache Insekticide, haben ein Chloratom im Phenolkern, Folithion hier eine Methylgruppe. Es ist möglich, daß sich auf Grund der Substitution im Phenolkern diese Derivate von E 605, E 600 und EPN 300 unterscheiden lassen (vgl. eigene Untersuchungen).

2) Mononitrophenole aus dem Abbau von Dinitrophenolen.

Die Abbauprodukte von 2,4-Dinitrophenol, (früher als Antisyphiliticum verwendet) und von Dinitro-o-cresol,

einem Pflanzenschutzmittel, sind z.T. p-Nitrophenolderivate. Es muß geprüft werden, ob sie die Indophenolblaureaktion stören können (siehe eigene Untersuchungen).

Eine dem Dinitro-o-cresol homologe Substanz ist das 4,6-Dinitro-2sec.butylphenol (DNBP)



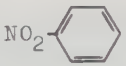
ebenfalls ein Pflanzenschutzmittel. Nach Rahn ist der Abbauweg jedoch wahrscheinlich ein anderer als bei Dinitro-o-cresol (DNOC). Es scheint eine Oxydation an der Seitenkette einzutreten, da mit Wasserstoffperoxyd behandeltes DNBP papierchromatographisch ähnliche Verbindungen wie die im Kaninchen-, Ratten- und Meerschweinchenharn gefundenen Stoffwechselprodukte lieferte.

Wichtig in diesem Zusammenhang ist, daß bei den genannten Tieren keine der beiden Nitrogruppen reduziert zu werden scheint. Da Dinitrophenole von Titantrichlorid nach unseren Erfahrungen nicht reduziert werden, dürfte die Indophenolblaureaktion wahrscheinlich negativ ausfallen. Über Metaboliten beim Menschen ist noch nichts bekannt.

3) Mononitrophenole aus dem Abbau von Nitrobenzolen und Nitrobenzolderivaten.

Die Stoffgruppe der Nitrobenzole findet in der Technik weite Anwendung. Im Körper werden Nitrobenzole zu Nitrophenolen oxydiert (Williams).

a) Nitrobenzol und Dinitrobenzole

α.) Nitrobenzol 

Im Handel wird es auch Mirbanöl genannt und kann als Zusatz in Seifen, Parfums, Schuhcremes und Stempelfarben gefunden werden. Auch als Abortivmittel wurde es verwendet (Moeschlin, Teleky). Bei einem Kaninchen führte eine einmalige Gabe von 0,25 g/kg Nitrobenzol (C^{14}) nach 4-5 Tagen zur Ausscheidung von 2% radioaktiven Kohlenstoffes durch die Atmung, von 58% durch den Urin, und zu 9% durch Faeces. Im Urin fanden sich 9% m-Nitrophenol, 9% p-Nitrophenol und 31% Aminophenol (Parke).

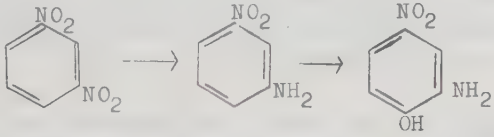
Das im Urin gefundene m-Nitrophenol kann kein Indophenol bilden. p-Aminophenol kann Indophenol bilden, ohne daß vorher eine Behandlung mit Titantrichlorid notwendig ist. Die Gelbfärbung der alkalischen Lösung fehlt jedoch bei p-Aminophenol. Zu Gelbfärbung in 2n NH_4OH und zur Indophenolblaureaktion führt das im Urin des Kaninchens ausgeschiedene p-Nitrophenol. Eine Nitrobenzol-Vergiftung könnte also unter Umständen mit einer E 605-Vergiftung verwechselt werden. Dies ist besonders bei Suicid- und Abtreibungsversuchen mit Nitrobenzol von Bedeutung, da die im allgemeinen aufgenommenen hohen Do-

sen möglicherweise viel p-Nitrophenol in den Harn gelangen lassen.

β.) Dinitrobenzole

Über o- und p-Dinitrobenzole liegen keine Stoffwechseluntersuchungen vor (Williams).

Mit C^{14}m-Dinitrobenzol stellte Parke 1956 Versuche am Kaninchen an (80-100 mg/kg). m-Dinitrobenzol wurde dabei zu 12 - 15% zu p-Nitro-o-aminophenol abgebaut, so daß eine positive Indophenolblaureaktion zu erwarten ist. Dieses Abbauprodukt ist mit dem des 2,4-Dinitrophenol identisch (vgl. eigene Untersuchungen).

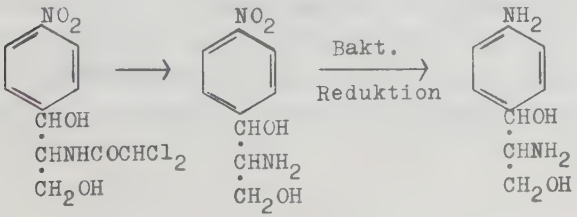


m-Dinitrobenzol 2-Amino-4-nitrophenol

b) Stoffwechsel verschiedener Nitrobenzolderivate.

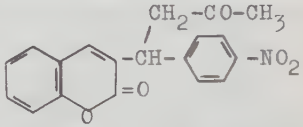
α.) Chloramphenicol

Es unterliegt einem entero-hepatischen Kreislauf. Während die Leber Chloramphenicol mit Glukuronsäure verestert, wird im Darm dieser Ester wieder gespalten (Fishman). Der Abbau erfolgt auf folgendem Weg:



Wie aus dem Schema ersichtlich, entsteht im Stoffwechsel kein p-Nitrophenol oder p-Aminophenol. Da keine Esterbindung zwischen Nitrobenzolring und aliphatischem Rest vorliegt, kann auch salzsaure Hydrolyse hier das Molekül nicht spalten. Eine Störung der Indophenolblaureaktion nach v.Eicken ist deshalb nicht anzunehmen. Daß auch beim Kochen in Lauge kein p-Nitrophenol entsteht, wie bisher angenommen wurde, zeigte J.Knabe. Die gelbe Farbe der Reaktionslösung wird durch 9 Azoverbindungen hervorgerufen.

ß.) Sintrom



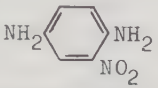
Auch Sintrom, ein Antikoagulans, kann keine Nitrophenolgruppe abspalten, weil keine Esterbindung vorliegt.

Kamm hat zwar darauf hingewiesen, daß die Nitrogruppe in saurem Milieu mit 15 % $TiCl_3$ reduziert werden kann, ohne daß vorher ein Nitrobenzol abgespalten worden wäre. Das bei anschließender Kupplung der Aminogruppe entstehende Aminodiazoniumsalz bildet rosa Flecken auf weißem Grund.

Der Versuch, Sintrom nach v.Eicken im sauren Milieu zu hydrolisieren, gelang nicht, ebensowenig eine Reduktion der Nitrogruppe mit verdünntem $TiCl_3$ in alkalischem Milieu vor und nach dem Hydrolyse-Versuch.

Eine Störung des p-Nitrophenol-Nachweises nach v.Eicken ist hier deshalb nicht zu erwar-

ten. Über den Stoffwechsel des Sintrom im Menschen ist allerdings bis jetzt nichts bekannt.

γ.) 2-Nitro-1,4-diaminobenzol 

Es ist nach Newburger in Haarfärbemitteln zu finden. Über den Stoffwechsel ist nichts bekannt. Die Substanz stand auch für Versuche nicht zur Verfügung. Eine Indaminbildung der beiden Aminogruppen in p-Stellung oder eine Indophenolbildung nach Oxydation im Stoffwechsel zu einem p-Nitrophenol ist nicht mit Sicherheit auszuschließen. Bei positiver Indophenolblaureaktion und Verdacht auf E 605-Vergiftung sollte deshalb auch an Vergiftung mit einem Haarfärbemittel gedacht werden, wenn ein solches in der Umgebung des Vergifteten gefunden wurde.

c) Halogenderivate der Nitrobenzole.

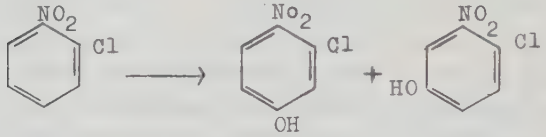
Von den Derivaten des Nitrobenzols haben besonders die Chlornitrobenzole neuerdings Bedeutung erlangt als Insekticide und Fungicide. Auch in der Farben- und Sprengstoffindustrie werden sie angewendet (Williams).

α.) Monochlornitrobenzole.

Diese Farbstoffzwischenprodukte können im Blut Methämoglobin bilden. Es werden oft Vergiftungen angemeldet.

α!) o-Chlornitrobenzol

Seine Stoffwechselabbauprodukte sind das 3-Chlor-4-nitrophenol und das 4-Chlor-3-nitrophenol (Williams).

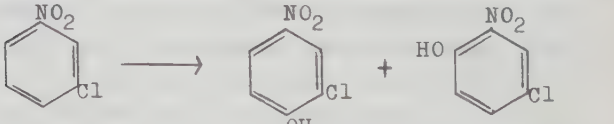


o-Chlornitrobenzol — 3-Chlor-4-nitrophenol — 4-Chlor-3-nitrophenol

Da aufgrund dieser im Harn ausgeschiedenen Metaboliten eine o-Chlornitrobenzol-Vergiftung mit einer Chlorthion-Vergiftung oder E 605-Vergiftung verwechselt werden könnte, wurden eigene Untersuchungen angestellt und die Unterscheidbarkeit geprüft (s. S. 38).

β!) m-Chlornitrobenzol

Im Stoffwechsel entsteht daraus 2-Chlor-4-nitrophenol und 4-Chlor-2-nitrophenol (Williams).

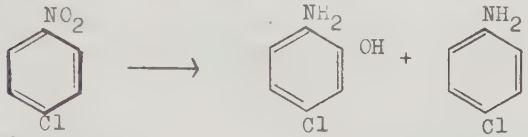


m-Chlornitrobenzol — 2-Chlor-4-nitrophenol — 4-Chlor-2-nitrophenol

Auch hier ist mit einer Reaktion des 2-Chlor-4-nitrophenols entsprechend v.Eicken zu rechnen. Versuche waren jedoch nicht möglich, da keine Substanz verfügbar war.

γ.) p-Chlornitrobenzol

Es wird vom Organismus des Kaninchens zwar an der Nitrogruppe reduziert und z.T. in o-Stellung zu Phenol oxydiert, das Chloratom in p-Stellung wird jedoch nicht abgespalten (Williams).

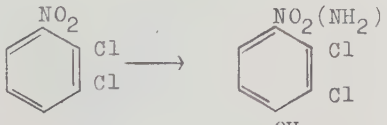


p-Chlornitrobenzol — 3-Chlor-6-aminophenol — p-Chloranilin

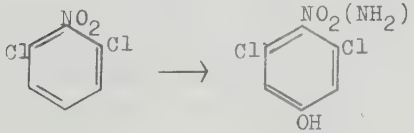
Eine Gelbfärbung in 2n NH_4OH ist nicht möglich, weil die Nitrogruppe des o-Phenols reduziert wurde. Die Indophenolblaureaktion muß negativ sein, weil in p-Stellung ein Chloratom sitzt statt einer Hydroxylgruppe.

β.) Dichlornitrobenzole.

2,3- 2,6- und 3,5-Dichlornitrobenzole werden im Kaninchen hauptsächlich in die entsprechenden Nitro- und Aminodichlorphenole umgewandelt. (Williams).



2,3-Dichlornitrobenzol — 2,3-Dichlor-4-nitrophenol

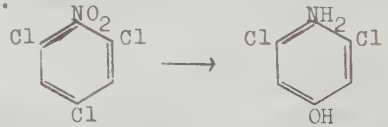


2,6-Dichlornitrobenzol — 2,6-Dichlor-4-nitrophenol

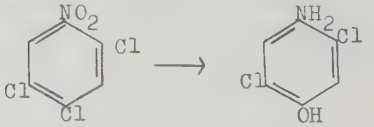
Von den phenolischen Abbauprodukten sind bei der Indophenolblaureaktion Farbwirkungen zu erwarten, welche die Nachweisreaktion nach v.Eicken ergeben können. Auch die Voraussetzungen für eine Gelbfärbung in 2n NH_4OH sind gegeben. Deshalb wurden mit 2,6-Dichlornitrophenol eigene Untersuchungen durchgeführt (s. S.38).

γ.) Trichlornitrobenzole.

Auch sie finden hauptsächlich als Pflanzenschutzmittel Verwendung. 2,4,5- und 2,4,6-Trichlornitrobenzole sind hier interessant, da im Stoffwechsel des Kaninchens in geringem Umfang Chloratome durch Hydroxylgruppen ersetzt werden können (Williams).



2,4,6-Trichlornitrobenzol → 3,5-Dichlor-4-aminophenol

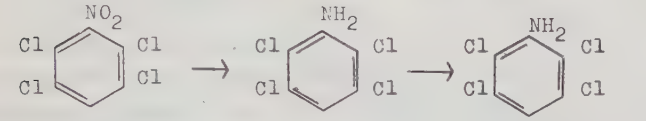


2,4,5-Trichlornitrobenzol → 3,6-Dichlor-4-aminophenol

3,5-Dichloraminophenol und 3,6-Dichloraminophenol waren nicht verfügbar. Mit einer Indophenolblaureaktion ist zu rechnen, mit einer störenden Gelbfärbung allerdings nicht.

δ.) Tetrachlornitrobenzol.

2,3,5,6-Tetrachlornitrobenzol hat seit neuestem große Bedeutung als Fungicid. Aus ihm bildet sich im Stoffwechsel des Kaninchens zu 15% Tetrachlor-p-Aminophenol (Betts, James, Thorpe).



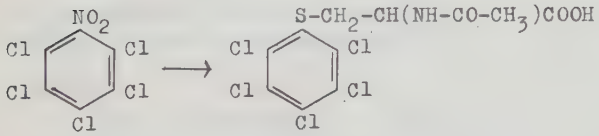
2,3,5,6-Tetrachlor-nitrobenzol

Tetrachlor-p-aminophenol

Auch hier ist es denkbar, daß im Harn eine positive Indophenolblaureaktion auftritt, wegen der vorherigen Reduktion der Nitrogruppe aber keine Gelbfärbung in 2n NH_4OH.

ε.) Pentachlornitrobenzol.

Dieses Pflanzenschutzmittel ist als "Brassicol" im Handel. Durch Bildung von Mercaptursäure kann die Nitrogruppe eliminiert werden (Williams).



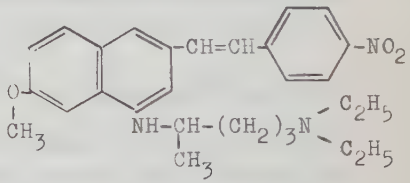
Da das Chloratom in p-Stellung zur Nitrogruppe nicht abgespalten wird, und z.T. die Nitrogruppe selber eliminiert wird, ist eine Störung des p-Nitrophenol-Nachweises nach v.Eicken nicht zu erwarten.

4) Aromatische Nitroverbindungen als Futterzusätze.

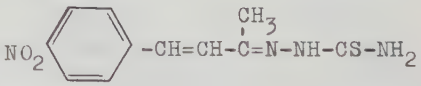
Aromatische Nitroverbindungen spielen auch in der Veterinärmedizin eine Rolle als Medikamente. Es ist zu prüfen, ob sie eine positive Indophenolblaureaktion liefern und damit eine E 605-Vergiftung vortäuschen können.

Über den Abbauweg der folgenden Stoffe ist, mit einer Ausnahme, nichts bekannt. Da es sich nicht um Nitrophenol-Ester sondern um Nitrobenzol-Verbindungen handelt, können sie durch Esterasen oder Hydrolyse nicht gespalten werden. Eine Störung der Indophenolblaureaktion nach v.Eicken ist also kaum zu erwarten.

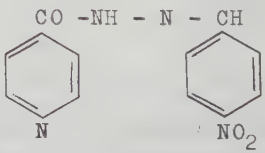
1. Trichomonacid,
   ein Chemotherapeuticum



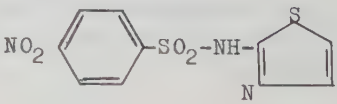
2. Parabortine,
   ein Tuberculostaticum

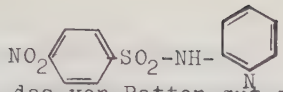


3. Nitrocid,
   ein Tuberculostaticum



4. Nitrosulfathiazol,
   ein Sulfonamid



5. Nisulfadine, 
ein Sulfonamid, das von Ratten gut zu Sulfanilamid reduziert wird (Kohl und Flynn).

D) Eigene Untersuchungen.

Auch die eigenen Untersuchungen dienten zur Beantwortung der drei eingangs gestellten Fragen. Es wurde zu klären versucht, ob

1. bei den einzelnen Reaktionsschritten aus anderen Verbindungen Stoffe entstehen können, die die Sicherheit des p-Nitrophenol-Nachweises beeinträchtigen können,

und

2. mit welcher Sicherheit man aus dem Vorhandensein von p-Nitrophenol auf das Vorliegen einer E 605-Vergiftung schließen kann.

Vorausgeschickt wird eine Beschreibung der Arbeitsmethode, die bei den Untersuchungen angewandt wurde.

I. Durchführung des E 605-Nachweises nach v.Eicken.

1) Hydrolyse: 1 ml Urin wird mit Wasser zu 10 ml verdünnt, mit 2 ml konz. Salzsäure versetzt und eine Stunde lang im verschlossenen Gefäß in ein kochendes Wasserbad gegeben.

2) Extraktion: Das bei der Hydrolyse freigewordene p-Nitrophenol wird mit 25 ml eines Lösungsmittelgemisches (1 % Lösung von Isoamylalkohol in einer Mischung von 4 Vol. Petroläther mit einem Vo-

lumen Äther) extrahiert. Nach kurzem Zentrifugieren pipettiert man 20 ml der Lösungsmittelschicht ab. Die Grundlagen dieser Extraktionsmethode wurde von Lawford und Harvey [illegible]eitet.

3) Salzbildung: Gibt man zu diesem p-Nitrophenol enthaltenden Lösungsmittelgemisch 4 ml 2n NH_4OH-Lösung und schüttelt in einem Scheidetrichter 2 min. lang aus, dann färbt sich die wässrige Phase gelb: es hat sich das Ammoniumsalz des p-Nitrophenols gebildet. Das Absorptionsmaximum dieses gelben Salzes liegt bei 400 nm.

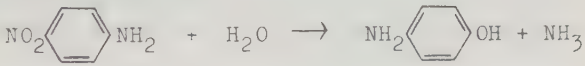
4) Reduktion und Kupplung: Nach 15 Minuten läßt man die wässrige Schicht aus dem Scheidetrichter in ein Reagenzglas ab, setzt 0,5 ml einer wässrigen o-Kresol-Lösung und 0,03 ml einer 15%igen $TiCl_3$-Lösung (entsprechend 0,5 ml der verdünnten $TiCl_3$-Lösung nach v.Eicken) zu und schüttelt 1 min. lang bis zum Farbloswerden der Lösung. Abzentrifugieren des Titanhydroxyds. Nach genau 30 min. bestimmt man die Extinktion bei 620 nm im Pulfrichphotometer in einer 1 cm Küvette. Es ist notwendig die Zeit von 30 min. einzuhalten, da nach 35 min. die Farbtiefe langsam abnimmt.

II. Zur Störung des p-Nitrophenolnachweises.

1) Hydrolyse.

Versuche mit p-Nitranilin und Yomesan haben gezeigt, daß durch Hydrolyse auch von anderen Stoffen als von E 605 p-Nitrophenol bzw. p-Nitranilinderivate abgespalten werden können.

a) p-Nitroanilin:



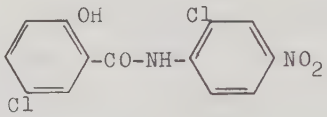
Löst man p-Nitranilin in 2 n NH_4OH(10 γ/ml) und hydrolysiert nicht, dann ergibt sich eine Gelbfärbung bei 380 nm. Das Maximum der Indophenolblaureaktion ohne vorherige Hydrolyse liegt bei 531 nm.

Nach einstündiger salzsaurer Hydrolyse und anschließender Extraktion tritt bei Zugabe von 4 ml 2n NH_4OH eine Gelbfärbung mit dem Maximum bei 398 nm auf. Das Maximum der Indophenolblau-Reaktion liegt bei 618 nm. Die Konzentration der untersuchten Lösung betrug 50 γ/ml 2n NH_4OH.

Die Farbänderung von 380 auf 398 nm bzw. von 531 auf 618 nm kann dadurch erklärt werden, daß von p-Nitranilin bei der Hydrolyse die Aminogruppe abgespalten und durch eine Hydroxylgruppe ersetzt wurde. Daß p-Nitrophenol vorliegt, kann aus dem Absorptionsmaximum von 398 bzw. 618 nm geschlossen werden.

b) Yomesan:

N-(2'-Chlor-4'-nitrophenyl)-5-chlorsalizylsäureamid



Es ist ein Bandwurmmittel.

Vor der Hydrolyse trat in 2n NH_4OH eine Gelbfärbung mit zwei deutlichen Absorptionsmaxima bei 339 und 374 nm auf.

Nach der Hydrolyse war nur noch ein einziges deutliches Maximum der Gelbfärbung da und zwar bei 346 nm. Daß die Carbamidbindung durch die Hydrolyse geöffnet wurde, ist anzunehmen. Welche Spaltprodukte durch die Hydrolyse entstanden sind, ist nicht geklärt.

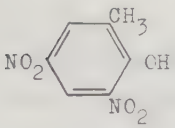
Auffällig ist, daß die anschließende Indophenolblaureaktion negativ ausfiel. Eine Störung des E 605-Nachweises nach v.Eicken ist also nicht zu erwarten. Über den Abbauweg des Yomesans ist nichts bekannt.

2. Reduktion.

Eine Voraussetzung für die Sicherheit des p-Nitrophenolnachweises nach v.Eicken ist, daß Di- und Trinitrophenole nicht von Titantrichlorid zu Mononitrophenolen reduziert werden, welche dann unter Umständen stören könnten. Die Untersuchung einiger Di- und Trinitroverbindungen zeigten, daß sie unter den von v.Eicken gewählten Bedingungen nicht von $TiCl_3$ reduziert wurden. Die Gelbfärbun-

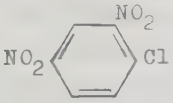
gen der Di- und Trinitrophenole in 2n NH_4OH ließen sich spektrophotometrisch von der gelben Farbe des p-Nitrophenols unterscheiden (vgl. Seite 41 Gasparic). Im einzelnen handelte es sich um:

a) Dinitro-o-cresol (= Lutin neu)



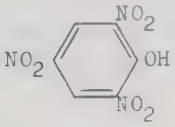
ein Pflanzenschutzmittel. Es zeigte vor und nach dem Versuch einer Reduktion mit $TiCl_3$ zwei Absorptionsmaxima bei 430 und 390 nm. Die Konzentration betrug 2,5 γ/ml 2n NH_4OH.

b) 2,4-Dinitrochlorbenzol:



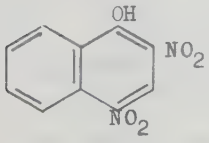
Diese Verbindung hat keine Hydoxylgruppe, deshalb ergibt sich auch keine Gelbfärbung.

c) Trinitrophenol (= Pikrinsäure)



Es wird in der Sprengstoffherstellung verwendet. Sein Absorptionsmaximum liegt bei 355 nm und wird von $TiCl_3$ nicht beeinflußt (Konz. 5 γ/ml 2n NH_4OH).

d) 2,4-Dinitroaphthol (= Martiusgelb)



Martiusgelb ist inzwischen als Farbstoff für Lebensmittel verboten worden. Zwei Absorptionsmaxima sind vorhanden (436 und 394 nm). Konz. 10 γ/ml 2n NH_4OH.

Auch hier waren die Hydrolyse und der Reduktionsversuch mit $TiCl_3$ ohne Einfluß auf die Lage der Absorptionsmaxima.

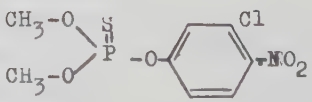
Das Reduktionsmittel $TiCl_3$ erhöht also die Sicherheit der Nachweismethode für p-Nitrophenol nach v.Eicken dadurch, daß es für eine Reduktion von Di- und Trinitrophenolen im alkalischen Milieu zu schwach ist.

III. Untersuchungen zur Ausscheidung von p-Nitrophenolen anderer Herkunft als aus E 605.

Beim Versuch einer Bestimmung der Grenzen der Spezifität des E 605-Nachweises nach v.Eicken hat sich gezeigt, daß durch die Einwirkung des Stoffwechsels verschiedene Stoffgruppen p-Nitrophenol oder p-Nitrophenolderivate in den Harn gelangen lassen können. Zu diesen Stoffgruppen gehören Insekticide, die Dinitrophenole und die Nitrobenzole. Die Abbauprodukte dieser Stoffe wurden, soweit sie im Handel erhältlich waren, nach der bereits beschriebenen Arbeitsmethode untersucht und die Absorptionsmaxima der entstandenen gefärbten Lösungen bestimmt.

1) Insekticide:

a) Chlorthion

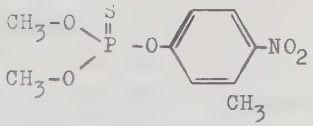


Untersucht wurde ein Präparat der Firma Bayer, Leverkusen. Das Maximum der Gelbfärbung lag bei

394 nm (10 γ/ml) in 2n NH_4OH), das der Indophenolblaureaktion bei 600 nm.

Das Chloratom als Substituent des p-Nitrophenols hat also die Lage des Absorptionsmaximums der Gelbfärbung nur wenig verschoben. Bei der Indophenolblaureaktion ist jedoch eine Unterscheidung zwischen Chlorthion und E 605 möglich.

b) Folithion



Dieses Insekticid hat eine Methylgruppe im Phenolkern.

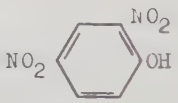
Eine Folithion-Emulsion der Firma Bayer (Wirkstoff Fenitrothion) wurde untersucht. In 2n NH_4OH-Lösung hat das bei der Hydrolyse von Folithion entstandene 4-Nitro-3-methylphenol ein Maximum der Gelbfärbung bei 394 nm (100 γ/ml, Emulsion). Zwischen Chlorthion und Folithion kann also nicht unterschieden werden, da beide Stoffe eine Gelbfärbung mit dem Maximum bei 394 nm haben. Ebenso sind die beiden Stoffe schwer von E 605 zu unterscheiden. (Maximum der Gelbfärbung 394 bzw. 400 nm).

Die Indophenolblaureaktion unter Verwendung von o-Kresol liefert ein Maximum bei 641 nm. Durch sie ist daher eine Unterscheidung zwischen Chlorthion (600 nm), E 605 (620 nm) und Folithion (641 nm) gut möglich.

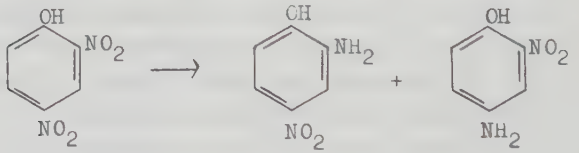
2) Dinitrophenole:

Wie bereits ausgeführt, werden die Dinitrophenole im Stoffwechsel zu Mononitrophenolen reduziert. Die in diesem Zusammenhang interessanten Stoffwechselabbauprodukte des 2,4-Dinitrophenols und des Dinitro-o-cresols wurden daraufhin untersucht, ob sie die Nachweismethode nach v.Eicken stören können.

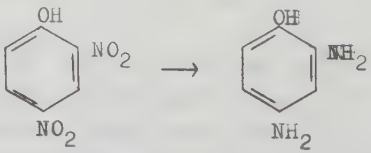
a) 2,4-Dinitrophenol



Es wurde früher als Antisyphiliticum verwendet. Seine Abbauprodukte im Menschen und Hund sind vermutlich 2-Amino-4-nitrophenol, 4-Amino-2-nitrophenol und 2,4-Diaminophenol (Guerbet und Mayer 1932 und Georgescu 1932).



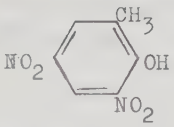
2,4-Dinitrophenol — 2-Amino-4-nitrophenol — 4-Amino-2-nitrophenol



2,4-Dinitrophenol — 2,4-Diaminophenol

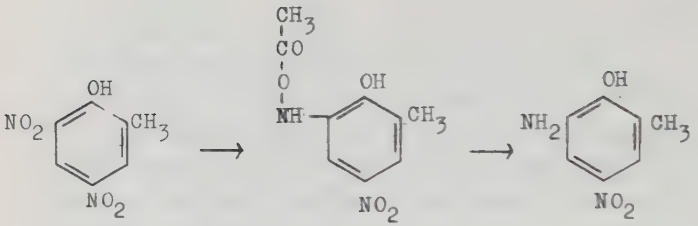
Wegen seiner strukturellen Ähnlichkeit mit p-Nitrophenol wurde 4-Nitro-2-aminophenol untersucht. Dabei lag das Maximum der Gelbfärbung bei 446 nm (5 γ/ml). Die Indophenolblaureaktion fiel negativ aus. Dieses Versuchsergebnis überrascht. Bei der Gelbfärbung fällt auf, daß die Aminogruppe das Maximum um 46 nm zur Seite der längeren Wellen hin verlagert hat. Durch das Chloratom oder die Methylgruppe als Substituenten des p-Nitrophenols wurde das Maximum nur um 6 nm und zwar zur Seite der kürzeren Wellen hin verschoben (394 statt 400 nm). Ebenso auffällig ist, daß die Aminogruppe keine Indophenolblaureaktion zustandekommen läßt. Eine Störung der Nachweismethode nach v.Eicken ist jedenfalls ausgeschlossen.

b) Dinitro-o-Cresol



Mit diesem Präparat wurde früher die Fettsucht bekämpft. Heute ist 2,4-Dinitro-o-cresol (= DNOC) als Pflanzenschutzmittel und selektives Unkrautbekämpfungsmittel im Gebrauch.

Im Menschen wirkt es kumulativ und wird über Wochen hin langsam ausgeschieden. Hauptabbauprodukt ist beim Kaninchen das gepaarte 6-Acetamido-2methyl-4-nitrophenol (Smith, Smithies und Williams).



2,4-Dinitro-o-kresol

6-Acetamido-2-methyl-4-nitrophenol

4-Nitro-6-amino-o-kresol

Das bei der Hydrolyse entstehende 4-Nitro-6-amino-o-cresol hat eine Nitrogruppe in p-Stellung zur Hydroxylgruppe und kann deshalb evtl. die Nachweismethode nach v.Eicken stören. Da das 4-Nitro-6-amino-o-cresol nicht zu kaufen war, wurde es durch selektive Reduktion aus Dinitro-o-cresol dargestellt.

Darstellung des 4-Nitro-6-amino-o-cresols.

Ausgangsstoff: 2,4-Dinitro-o-cresol
(= Lutin neu der Firma
"Chem.Fabrik Marktredwitz AG")

Methode: Vorschrift nach Hodgson und Ward, die hier folgt:

"3,5-Dinitro-o-cresol (15 g.)", (= 2,4-Dinitro-o-cresol nach unserer Nomenklatur), "dissolved in water (100 c.c.) containing sodium hydroxide (3 g.), was treated at 80° with mixture B (96 c.c., 2,3 g.-mols/g.mol.dinitrocresol) and maintained at 85° for 2 hrs. To the mixture cooled to 0°, hydrochloric acid (20 c.c., d 1, 18)

was slowly added until a brown precipitate was formed (further addition precipitated a violet compound); the precipitate was separated, washed with water, mixed with excess calcium carbonate, extracted repeatedly with boiling toluene giving 5-nitro-3-amino-o-cresol (10,5 g., 80%). The residue (6 g.), insoluble in toluene contained sulphur dyes which dyed cotton directly to intense black shades.

Mixture B: Sodium hydroxide (4 g., 0,1 g.-mol.) dissolved in water (40 c.c.) and treated at 0° with hydrogen sulphide gas until the increase in weight corresponds with the complete formation of sodium hydrosulphide."

Übersetzung:

2,4-Dinitro-o-cresol (15 g) wird in Wasser gelöst (100 ml) das 3 g NaOH enthält. Diese Lösung wird bei $80^{\circ}C$ mit Lösung B behandelt und zwei Stunden lang auf $85^{\circ}C$ gehalten.

Zur auf $0^{\circ}C$ abgekühlten Mischung werden 20 ml Salzsäure (d = 1,18) langsam zugesetzt bis sich ein brauner Niederschlag gebildet hat (weiterer Salzsäurezusatz würde eine violette Verbindung ausfällen).

Der Niederschlag wird abgetrennt, mit Wasser gewaschen, mit einem Überschuß an $CaCO_3$ gemischt, und wiederholt mit kochendem Toluol extrahiert.

Der Extrakt enthält 4-Nitro-6-amino-o-cresol.

Der Rückstand, der in Toluol unlöslich ist, enthält Schwefelfarbstoffe, die Baumwolle direkt intensiv schwarz färben.

Lösung B: Natriumhydroxyd (4 g, 0,1 g-mol) wird in 40 ml Wasser gelöst und bei 0°C mit Schwefelwasserstoffgas behandelt, bis die Gewichtszunahme einem vollständigen Umsatz zu Natriumhydrosulfid entspricht.

Entsprechend dieser Vorschrift erhielten wir das Rohprodukt in Toluol gelöst. Läßt man bei Zimmertemperatur das Toluol Verdampfen, dann entstehen rotbraune, nadelförmige Kristalle (Schmelzpunkt 165°C nach Beilstein).

ß.) Reaktionen des 4-Nitro-6-amino-o-cresols.

4-Nitro-6-amino-o-cresol führt in einer 2n NH_4OH Lösung (5 γ/ml) zu einer Gelbfärbung mit dem Maximum bei 459 nm.

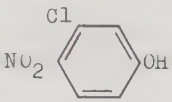
Die Indophenolblaureaktion war negativ. Ebenso wie beim 2-Amino-4-nitrophenol fällt die starke Verschiebung des Maximums der Gelbfärbung auf sowie die negative Indophenolblaureaktion. Es besteht also Grund zur Annahme, daß aminosubstituierte p-Nitrophenole die Nachweismethode nach v.Eicken nicht stören können.

3) Nitrobenzole:

Die chlorierten Nitrobenzole, die als Insekticide und Fungicide neuerdings große Bedeutung erlangt haben, können durch Oxydation im Stoffwechsel p-Nitrophenolderivate bilden. Um zu prüfen, ob die Abbauprodukte dieser Stoffgruppe die Indophenolblau-

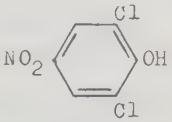
reaktion stören können, wurden 3-Chlor-4-nitrophenol und 2,6-Dichlor-4-nitrophenol untersucht.

a) 3-Chlor-4-nitrophenol



In 2n NH_4OH-Lösung (10 γ/ml) hat diese Substanz eine gelbe Farbe mit dem Maximum bei 390 nm. Auch die Indophenolblaureaktion ist positiv. Die blaue Lösung hat ein Absorptionsmaximum bei 600 nm. Eine Unterscheidung zwischen einer E 605-Vergiftung und einer 3-Chlor-4-nitrophenol-Vergiftung ist daher durch die Indophenolblaureaktion möglich. Da auch Chlorthion zu 3-Chlor-4-nitrophenol abgebaut wird, sind Chlorthion- und o-Chlornitrobenzol-Vergiftungen nicht zu unterscheiden.

b) 2,6-Dichlor-4-nitrophenol

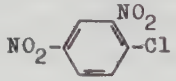


Es liefert in einer Konzentration von 2,5 γ/ml NH_4OH eine Gelbfärbung mit dem Maximum bei 400 nm. Bei der Indophenolblauprobe lag das Maximum bei 585 nm. Auch hier reicht das Messen des Absorptionsmaximums der Gelbfärbung nicht aus um p-Nitrophenol von seinem Dichlorderivat zu unterscheiden, was jedoch durch die Indophenolblaureaktion möglich ist.

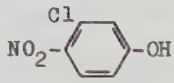
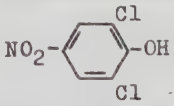
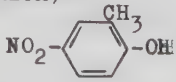
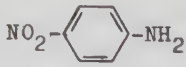
F) Zusammenstellung der Versuchsergebnisse,

welche bei der Anwendung der Nachweismethode nach v.Eicken auf die verschiedenen Stoffe gewonnen wurden.

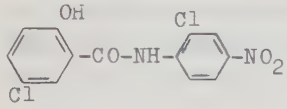
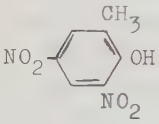
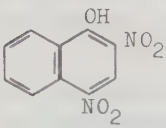
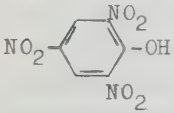
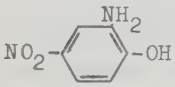
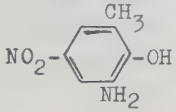
I.Folgende Stoffe ergaben keine Gelbfärbung in 2n NH_4OH:

Versuch Seite	Formel und Name	geprüfte Konzentr.	Maxima in nm bei Gelb-Färbung	Blau-
	p-Phenylendiamin	100γ/ml	--	546
30	2,4-Dinitrochlorbenzol	50γ/ml	--	--
				

II. Stoffe,die eine Gelb- und eine Blaufärbung lieferten:

38	3-Chlor-4-nitrophenol (Chlorthion)	10γ/ml	390	600
				
38	2,6-Dichlor-4-nitrophenol	2,5γ/ml	400	585
				
32	3-Methyl-4-nitrophenol (Folithion)	100γ/ml	394	641
				
28	p-Nitranilin	10γ/ml	380 (vor Hydrolyse)	531
		50γ/ml	398 (nach Hydrolyse)	618

III. Verbindungen,die nur eine Gelbfärbung zeigen:

Versuch Seite	Formel und Name	geprüfte Konzentr.	Maxima in nm bei Gelb- u.Blaufärbung
29	Yomesan 	5mg/ml	339/374 (v.Hydrolyse) -- 340 (n.Hydrolyse) --
34f	Dinitro-o-kresol 	2,5γ/ml	430/390 --
3o	Martiusgelb 	10γ/ml	436/394 --
3o	Trinitrophenol 	5γ/ml	355 --
33f	2-Amino-4-nitrophenol 	5γ/ml	446 --
37	4-Nitro-6-amino-o-kresol 	4γ/ml	459 --

Die Zusammenstellung der Versuchsergebnisse zeigt, daß nur Nitrophenole und Nitraniline eine Gelbfärbung in 2 NH_4OH ergeben. Deshalb sind p-Aminophenol, p-Phenylendiamin und 2,4-Dinitrochlorbenzol nicht gelb. Die Chlor- und Methylderivate des p-Nitrophenols haben das Maximum ihrer Gelbfärbung zwischen 390 und 400 nm. Sie sind also durch die Gelbfärbung kaum zu unterscheiden. Andererseits besteht umgekehrt bei Vorliegen eines Maximums zwischen 390 und 400 nm der Verdacht, daß p-Nitrophenol oder eines der Chlor- oder Methylderivate vorliegt.

Dinitro-o-cresol und Martiusgelb liefern neben einem Maximum bei 390 bzw. 394 nm ein zweites bei 430 bzw. 436 nm. Ähnliche Ergebnisse fand Gasparic bei allen 4,6-Dinitrophenolen, die ebenfalls zwei Maxima haben. Sie liegen etwa um 375 - 380 nm und um 400 - 420 nm, während p-Nitrophenole nur ein Maximum bei 408 - 415 nm aufwiesen.

Trinitrophenol (= Pikrinsäure) hat ein Maximum in 2n NH_4OH bei 355 nm. Ebenfalls sehr stark, nämlich von 400 auf 446 nm verschiebt sich das Maximum, wenn eine Aminogruppe an den Phenolkern gebunden ist (z.B. 2-Amino-4-nitrophenol, 4-Nitro-2-amino-o-cresol). Das Messen der Gelbfärbung reicht also zwar zu einem sicheren E 605-Nachweis nicht aus, aber aus der Lage der Maxima läßt sich unter Umständen bereits etwas über die Art der vorliegenden Nitroverbindungen sagen.

Vergleicht man die Versuchsergebnisse der Indophenolblaureaktion, so erkennt man, daß mit dieser Reaktion sich die wichtigsten Chlor- und Methylderivate des p-Nitrophenols unterscheiden lassen. Die geprüften chlorsubstituierten p-Nitrophenole verschieben die Lage des Ab-

sorptionsmaximums zur Seite der kürzeren Wellen hin (um 20 bzw. 35 nm). Das methylsubstiutierte p-Nitrophenol hat das Maximum der Blaufärbung bei 641 nm, also bezogen auf p-Nitrophenol zur Seite der längeren Wellen hin verlagert.

Auch die Indaminbildung mit p-Phenylendiamin läßt sich von einer Indophenolbildung gut unterscheiden (546 nm bzw. 620 nm).

Nicht geklärt ist, warum die Abbauprodukte des Dinitro-o-cresols und des 2,4-Dinitrophenols, sowie des Yomesans keine Indophenolblaureaktion ergeben.

G) Diskussion und Zusammenfassung.

Die Untersuchungen haben ergeben, daß die Spezifität der Nachweismethode für p-Nitrophenol nach v. Eicken sehr groß ist. Wird im Zweifelsfall auch noch auf ihre Grenzen geachtet, so sind Verwechselungen so gut wie ausgeschlossen. Zu demselben Urteil über die Spezifität kommt W.Pilz. Er untersuchte Luft- und Bodenstaub. Dabei modifizierte er die Indophenolblaureaktion, indem er Phenol dem o-Kresol als Kupplungssubstanz vorzog. Deshalb sind die von ihm angegebenen Meßwerte mit denen der Indophenolblaureaktion nach v.Eicken nicht vergleichbar. Interessant ist jedoch, daß bei der von ihm durchgeführten Indophenolblaureaktion mit o-Nitrophenol und m-Nitrophenol keine Blaufärbung auftrat, so daß auch von diesen Stoffen keine Störung der Indophenolblaureaktion nach v.Eicken zu erwarten ist.

Als eine ebenfalls sehr sichere und empfindliche Nachweismethode wird von Kaiser die papierchromatographische Bestimmung des p-Nitrophenols nach Pfeil und Goldbach

empfohlen. Die Grenze der Empfindlichkeit dieser Methode liegt bei 0,5 γ/ml, während sie bei der Nachweismethode nach v.Eicken um 2,5 γ/ml liegt.

Wird p-Nitrophenol im Harn gefunden und gleichzeitig das andere Spaltstück des E 605, die Diäthylthiophosphorsäure (nach der Methode von Fischer und Klingelhöller), so erhöht dieser Nachweis die Spezifität erheblich.

Literaturverzeichnis

Beilstein	Handbuch der organischen Chemie, 4. Auflage, Bd. 13, 63 und 574 Springer Berlin 1930
Betts, J.J., S.P.James and W.V. Thorpe	The metabolism of pentachlornitrobenzene and 2:3:4:6-tetrachloronitrobenzene and the formation of mercapturic acids in the rabbit. Biochem.J. 61, 611 (1955)
Brachet, J. and R. Jeener	Macromolecular cytoplasmic particles rich in pentosenucleicacid. Enzymologia 11, 196 (1944)
Bray, H.G., S.P. James und W.V. Thorpe	The metabolism of monochloronitrobenzenes in the rabbit. Biochem. J. 64, 38 (1956)
Bray, H.G., H.J. Lake and W.V. Thorpe	Metabolism of the derivatives of toluene. Biochem. J. 44, 136 (1949)
v.Eicken, S.	Zur Ausscheidung von p-Nitrophenol im Urin nach Einwirkung von Pflanzenschutzmittel E 605. Angew. Chem. 66, 551 (1954)

Fischer, R. und W. Klingelhöller — Der Nachweis und die quantitative Bestimmung von Thiophosphorsäureestern in biologischem Material
Arch.Toxikol.19, 119 (1961)

Fishman, W.H. — Chemistry of Drug Metabolism
Charles C. Thomas,
Springfield Illinois 1961

Gasparic, J. — An anomalous chromatographic behaviour of some di- and trinitrophenols
Journal of Chromatography 15, 83 (1964)

Georgescu, J. — Ann. Pysiol. Physicochim.biol. 8, 122 (1932)
Zit. Williams

Geßner, O. — Gift- u. Arzneimittelpflanzen von Mitteleuropa, 2. Aufl.
S. 564,
Carl Winter, Universitätsverlag Heidelberg 1953

Gierer, J. — The reaction of quinone monochlorimide with lignin.
Chem.Ber. 89, 257 (1956)

Guerbet, M. und A. Mayer — Ann. Physiol.Physicochim.biol. 8, 117 (1932)
Zit. Williams

Hodgson, H.H. and E.R. Ward — The preferential reduction of nitrogroups in polynitrocompounds. Part III. Picric acid and 3:5-dinitro-o-cresol J.Chem.Soc. (London) 1945, 663

Hückel, W. — Theoretische Grundlagen der organischen Chemie, Bd. 1, S. 340, 3. Aufl. Akademische Verlagsgesellschaft Leipzig 1940

Kaiser, H. und Th. Haag — Zum chemisch-toxikologischen Nachweis von E 605 "Bayer" sowie anderer Insekticide der Thiophosphorsäurereihe Arch.Pharm. 289/61, 542 (1956)

Karrer, P. — Lehrbuch der organ. Chemie, 9. Aufl. Georg Thieme, Leipzig, 1943

Knabe, J. — Untersuchungen am Chloramphenicol Mitteilungen der Deutschen Pharmatzeut.Gesellschaft und der Pharmazeut.Gesellschaft der DDR 35, 94 (1965)

Kohl, M.F.F. and L.M.Flynn — Reduktion of isomeric benzoic acids by rats Proc.Soc.exp.Biol.Med., N.Y. 47, 470 (1941)

Lawford D.J. and D.G. Harvey — Determination of p-nitrophenol in urine and in blood
Analyst 78, 63 (1953)

Mikhailov, G. — The synthesis of oxydation-reduction indicators of the indophenol series.
Trans.Inst.Pure Chem. Reagents (USSR), 17, 45 (1939)

Mitolo, M. — Indophenol-oxydase of the central nervous system
Boll.soc.ital.biol.sper. 20, 829 (1945)

Moeschlin, S. — Klinik und Therapie der Vergiftungen, 3. Aufl.
Verl.G.Thieme, Stuttgart 1959

Negwer, M. — Organisch-Chemische Arzneimittel und ihre Synonyma
Akademie-Verlag Berlin (1959)

Newhurger, S.H. — Determination of 2-nitro-1,4-diaminobenzene in hair dyes
J.Assoc. Offic. Chem. 37, 519 (1954)

Pailer, M. — in: Fortschritte der Chemie organ. Naturstoffe
Herausgeber B. Zechmeister 18, 66 (1960)
Springer Verlag Wien

Parke, D.V. — The metabolism of [^{14}C] nitrobenzene in the rabbit and guinea pig
Biochem.J. 62, 339 (1956)

Pilz, W. — Die Bestimmung kleiner Mengen E 605 und Methyl-E 605 in Luft und Bodenstaub
Mikrochim. Acta 3, 383 (1958)

Rahn, H.W. — Über den papierchromatographischen Nachweis toxikologisch wichtiger Nitroverbindungen und ihrer im Stoffwechsel entstehenden Abbauprodukte
Arch.exp.Path. u. Pharmakol. 241, 521 (1961)

Römpp, H. — Chemie Lexikon, 5. Aufl. S. 3501, Franckh'sche Verlagsbuchhandlung Stuttgart 1962

Smith, J.N. R.H. Smithies and R.T.Williams — Urinary metabolites of 4:6-dinitro-o-cresol in the rabbit
Biochem.J. 54, 225 (1953)

Schrader, G. — Die Entwicklung neuer insektizider Phosphorsäureester, 3. Aufl. Verlag Chemie GmbH., Weinheim/ Bergstr. 1963

Svoboda, W., L.Dorazil and J.Körbl — Metallochromic indicators
Collection Czech.Chem.Communis. 25, 1037 (1960)
C.A. 54, 13939 e (1960)

Teleky, L. Gewerbliche Vergiftungen
Berlin, Springer-Verlag 1955

Williams, R.T. Detoxication Mechanism
2. Aufl.
Chapmann and Hall LTD, London 1959

Zum Schluß der Arbeit erlaube ich mir, Herrn Professor Dr.Dr. E. Weinig für die Überlassung des Themas meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Priv.-Doz. Dr.Dr. M. Geldmacher-v.Mallinckrodt für die zahlreichen Anregungen und für die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Lebenslauf.

Am 28.9.1934 wurde ich, Adolf Herrmann, als Sohn der Schuhmacherseheleute Georg und Frieda Herrmann, geb.Müller, in Nördlingen geboren. Mit drei jüngeren Geschwistern wuchs ich im Elternhaus auf. Im Jahre 1941 trat ich in die Volkschule, 1946 in die Oberrealschule in Nördlingen ein, die ich im Juli 1954 absolvierte. Nach 6 Semestern Studium der Theologie in Heidelberg begann ich 1959 mit dem Studium der Medizin. Das Physikum legte ich im August 1961, die ärztliche Prüfung im April 1965 ab.
Von Mai bis August 1965 war ich als Medizinalassistent am Institut für gerichtliche Medizin und Kriminalistik der Universität Erlangen-Nürnberg tätig. Seit September 1965 bin ich Medizinalassistent am Kreiskrankenhaus Illertissen.

Am 26.10.1962 heiratete ich Roswitha Zimprich aus Neu-Ulm, zur Zeit Lehramtsanwärterin für Mittelschulen.

Illertissen, den 25.5.66

Adolf Herrmann

Buchdruck und Fotodruck: Ludwig Müller, Erlangen, Fabrstraße 5